ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット

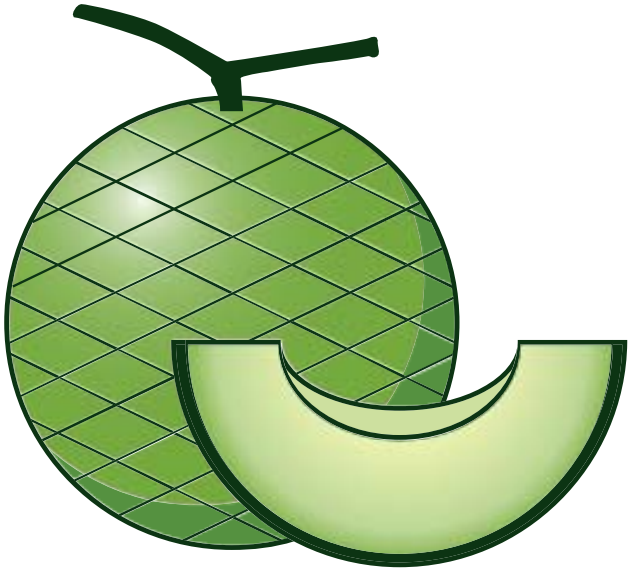
Cucurbit chlorotic yellows virus Detection Kit

取扱説明書

version 5.0.0

製品コード

NE0081



ニッポン・ジーン

ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット
取扱説明書 version 5. 0. 0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP法を用いてウリ類退緑黄化ウイルスを検出するための試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットの保存方法は、**【キット内容と保存温度】**（2ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. 本キットを使用する際は、この取扱説明書の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび**CCYV陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

6. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン； http://nippongene-analysis.com/

7. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

8. LAMP法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP法を用いたウリ類退緑黄化ウイルス検出用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

9. **ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
   株式会社富士通システムズ・イースト
   e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）； http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

1. キット説明……1

ウリ類退緑黄化ウイルス検出キットの概要
ウリ類退緑黄化ウイルスとその診断
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して

2. キット内容……2

キット内容と保存温度

3. 必要な器具、機器、および試薬……3

4. キット使用方法……5

簡易プロトコル……5
検査を行う前の準備と注意事項……7
サンプルの準備
器具、機器の準備
検査環境
詳細な使用方法……11
RNAサンプルの作製
検査溶液の作製
検査反応
判定

5. トラブルシューティング……16

6. 文献・資料……17

7. 付録……18

品質管理
CCYV陽性コントロールのコピー数
メモ

本キットに含まれているプライマーセットおよびこのプライマーセットを用いたLAMP法によるウリ類退緑黄化ウイルスの検出技術は、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「タバココナジラミにより媒介される新規ウリ科野菜ウイルス病の統合型防除技術体系の開発」において、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターによって開発されました。

1. キット説明

【ウリ類退緑黄化ウイルス検出キットの概要】

本キットは、LAMP法を利用してキュウリあるいはメロンの葉からウリ類退緑黄化ウイルス（Cucurbit chlorotic yellows virus；略称CCYV）を検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便なDNA増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、逆転写酵素を用いてcDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うRT-LAMP法によりCCYVゲノムRNAの一部を増幅し、増幅の有無からCCYVの存在を判定します。

検出に必要な操作は、キットに添付の**CCYV吸着液**と**CCYV洗浄液**を用いて葉から抽出したRNAを検査溶液（**CCYV検査液**、**CCYV酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に添加し、63℃に60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。検体中にCCYVが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってCCYVゲノムRNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体中にCCYVが存在しない場合には、DNA増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、cDNA合成からDNA増幅反応、検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でCCYVゲノムRNAを検出することが可能です。

【ウリ類退緑黄化ウイルスとその診断】

ウリ類退緑黄化ウイルス（CCYV）は、2007年に日本において新規に確認された植物ウイルスです。CCYVは、タバココナジラミにより媒介される新種のクロステロウイルスに分類されます。現在までに、キュウリ、メロン、スイカへの感染が確認されており、感染した植物では退緑小斑点や小黄斑が発生し、徐々に拡大して黄化葉となります。その結果、キュウリでは最大30%の果実収量の減少、メロンでは果実重量と果実糖度の著しい低下を引き起こします。また、スイカでは黄化葉の周縁または葉脈間からえそを生じ、症状が激しい場合は葉が枯死します。CCYVは、タバココナジラミバイオタイプQおよびバイオタイプBにより媒介されることから、タバココナジラミを施設内に入れないこと、増やさないこと、逃がさないことが重要となります。健全株への感染拡大を防止するためには感染株の早期発見と除去が不可欠となります。

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。また、増幅する対象の遺伝子がRNAである場合には、逆転写酵素を用いることにより、cDNA合成とDNA増幅を同一反応チューブ内で行うことが可能です（RT-LAMP法）。

LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE；http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアル ホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル；http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット
24テスト用（製品コード: NE0081）

試薬名（チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量	保存温度
取扱説明書	−	1部	室温
検査用チューブ	−	24本	室温
CCYV検査液	赤色	525 µl	−20°C（遮光）
CCYV酵素液	緑色	25 µl	−20°C（遮光）
蛍光発色液	紫色	25 µl	−20°C（遮光）
CCYV陽性コントロール	灰色	25 µl	−20°C（遮光）
ミネラルオイル	青色	500 µl	−20°C（遮光）
CCYV吸着液	橙色	1,000 µl x 2本	4°C/−20°C（遮光）
CCYV洗浄液	−	15 ml	4°C/−20°C（遮光）

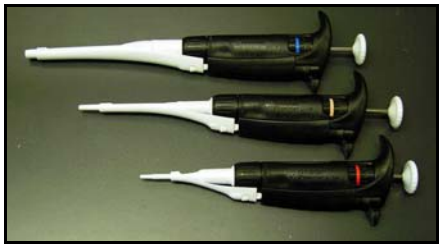
取り扱い上の注意

- 本キットでは、25テスト分の検査溶液を作製することにより、24テスト分の検査反応を行うことが可能です。24テスト以下の検査反応を複数回行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。
- **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。
- 各試薬は上表に記載の温度で遮光して保存し、納品後6ヶ月以内に使用してください。
- **CCYV検査液**、**CCYV陽性コントロール**および**ミネラルオイル**は−20°Cでの保存中に凍結しますので、使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20°Cで保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。
- **CCYV酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に放置したり、過度の冷却により凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。
- **CCYV陽性コントロール**は、ウリ類退緑黄化ウイルスゲノムに特徴的な配列を含むRNA溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の物に接触したりしないようご注意ください。
- 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは1回分注するごとに使い捨てとして使用してください。
- **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

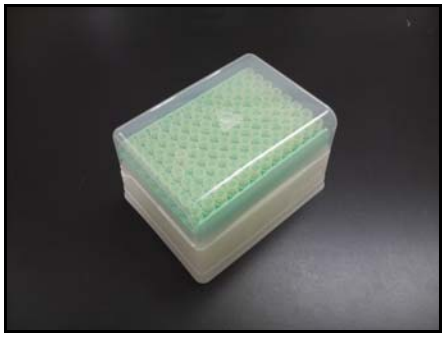
3. 必要な器具、機器、および試薬

【必ずご準備頂く器具、機器、および試薬】

- マイクロピペット
  (0.5–10 µl、10–100 µl、200–1,000 µl)



- フィルター付マイクロチップ（滅菌済）*



- マイクロチューブ
  (1.5 mlあるいは2.0 ml)

- 使い捨て手袋

- 蒸留水
  蒸留した脱イオン水をオートクレーブで121°C、40分間滅菌処理したものをご使用ください。

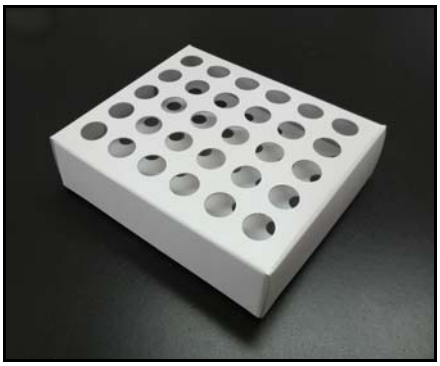
- インキュベーター（恒温器）
  ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、63°Cを保持する機器が必要です。

- 氷（クラッシュアイス）

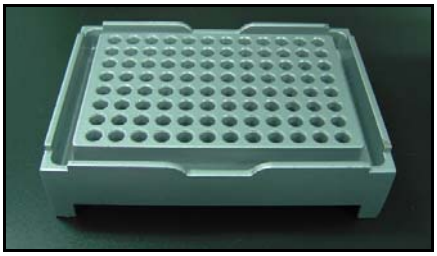
【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック（1.5–2.0 mlチューブ用）*



- アルミラックあるいはプレートラック
  (0.2 mlチューブ用)



● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5–2.0 mlチューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 mlチューブ用）

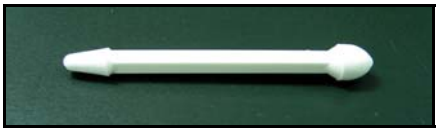
● 高速遠心機（5,000–15,000 rpm）
＜チューブキャプチャー法＞によるRNAサンプル作製の際に使用します。

● フロートプレート*

● UV照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。240–260 nmあるいは350–370 nmの範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

● 磨砕用ペッスル



● 木製の爪楊枝

＊マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子ツールボックス**（製品コード： NE4111）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

4. キット使用方法

【簡易プロトコル】

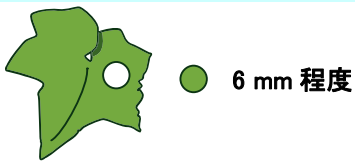
＊　本キットの詳細な使用方法に関しては11ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

1.　RNA サンプルを作製する

チューブキャプチャー法

ⅰ.　葉をパンチ等で打ち抜き、5 枚程度を 1.5 ml チューブに入れる



ⅱ.　蒸留水 1 ml を添加してペッスルで磨砕する

ⅲ.　5,000 rpm、30 秒間、室温にて遠心する

ⅳ.　上清 25 µl を新しいチューブに移す

ⅴ.　CCYV 吸着液 75 µl を添加して十分に混合する

ⅵ.　5,000–15,000 rpm、1 分間、室温にて遠心する

ⅶ.　CCYV 吸着液を除去し、CCYV 洗浄液 300 µl を添加する

ⅷ.　CCYV 洗浄液を除去し、もう一度 CCYV 洗浄液 300 µl を添加する

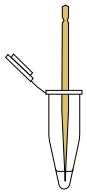
ⅸ.　再度、CCYV 洗浄液を除去し、蒸留水 50 µl に溶解する

爪楊枝法

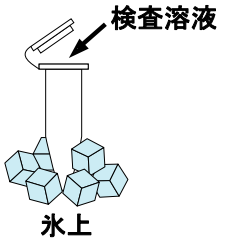
＊　高速遠心機を使用しない場合は、爪楊枝法で RNA サンプルを作製する。

ⅰ.　検査用チューブに蒸留水 5 µl を添加する

ⅱ.　葉脈部を爪楊枝で 10 回程度突き、蒸留水に軽く懸濁する



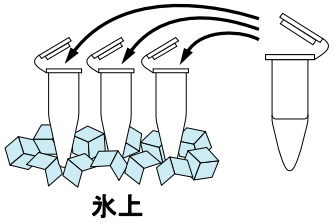
2. 検査溶液を必要量まとめて作製する



試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
CCYV 検査液	21 µl	189 µl	525 µl
蛍光発色液	1 µl	9 µl	25 µl
CCYV 酵素液	1 µl	9 µl	25 µl
合計	23 µl	207 µl	575 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

3. 検査溶液を 1 テストあたり 23 µl ずつ分注する



＊ 爪楊枝法の場合は検査溶液を直接 RNA サンプルに分注し、工程 5 に進んで下さい。

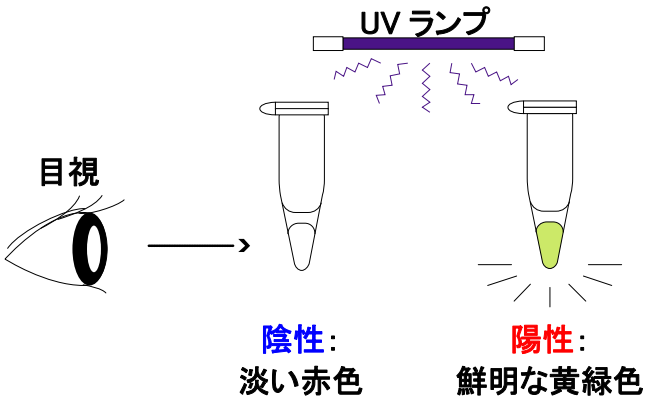
4. RNA サンプル 2 µl を添加する

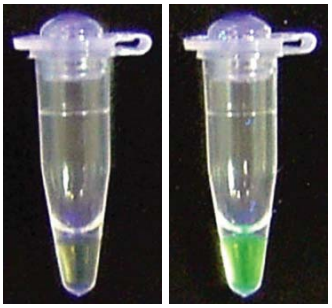
5. ミネラルオイル 20 µl を入れる

6. 63˚C、60 分間（検査反応）

7. 80˚C、2 分間（反応停止）

8. 判定





【検査を行う前の準備と注意事項】

サンプルの準備

■ **RNAサンプル**

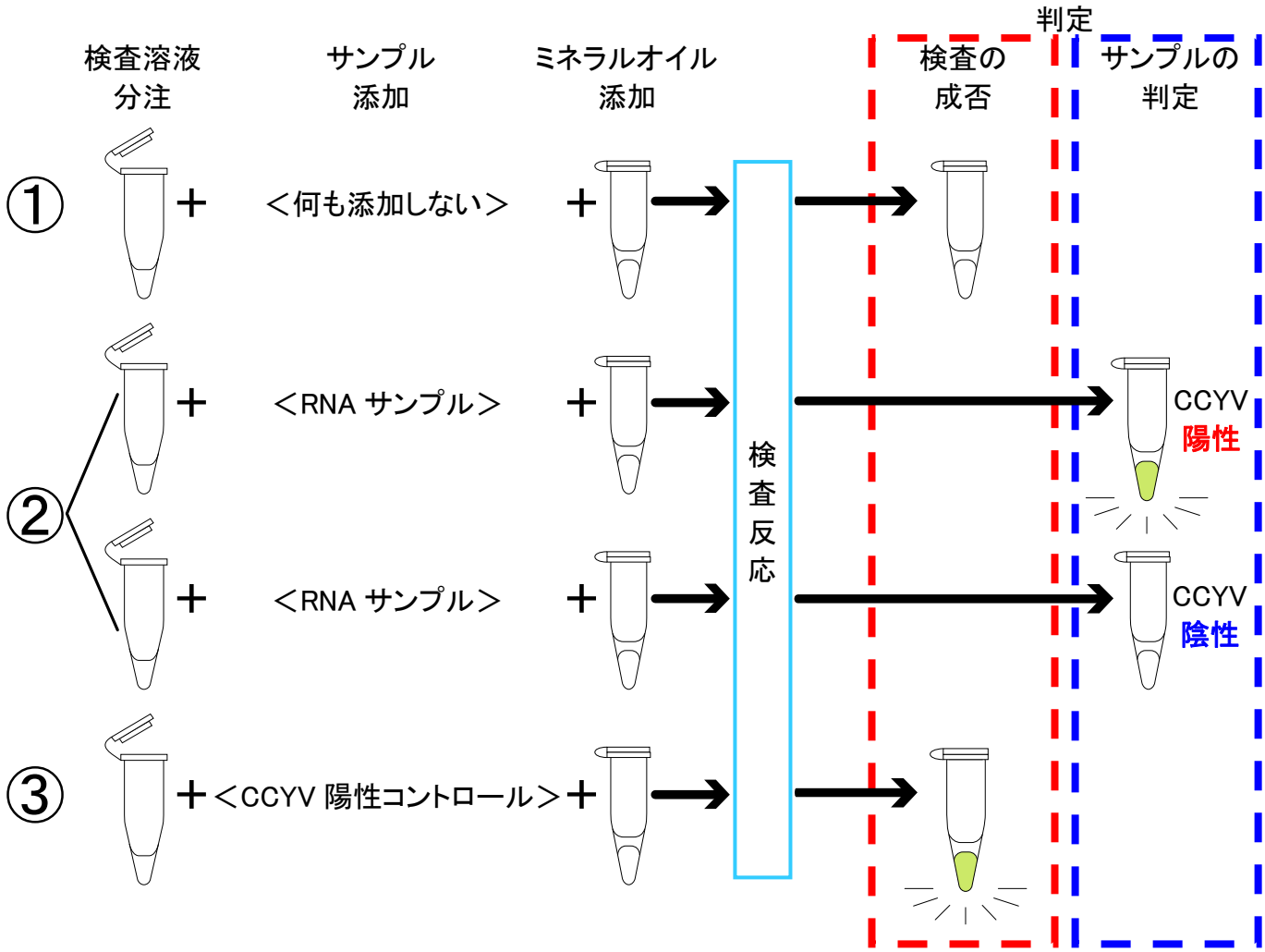
本キットでは、キュウリあるいはメロンの葉からウリ類退緑黄化ウイルスゲノムRNAを抽出するプロトコルとして、**＜チューブキャプチャー法＞**と**＜爪楊枝法＞**を備えています。**＜チューブキャプチャー法＞**で作製したRNAサンプルは保存することが可能であるため、検査結果が無効となった場合でも再試験が可能です。高速遠心機を使用しない場合は、**＜爪楊枝法＞**によりRNAサンプルを作製して、1回の検査反応で使い切ってください。

■ **コントロール**

本キットには、検査の成否を確認するための**CCYV陽性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、**CCYV陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および**CCYV陽性コントロール**やRNAサンプルを添加しない「陰性コントロール検査溶液」を作製することが重要です。

＜コントロール検査溶液調製例＞

＊　RNAサンプルや**CCYV陽性コントロール**が検査溶液に混入するのを防ぐため、操作は①→②→③の順で行ってください。詳細な手順に関しては11ページ以降を参照してください。



①陰性コントロール検査溶液：　検査溶液中に鋳型となる核酸が添加されていないため、DNA増幅が起こらず発色が見られません。

③陽性コントロール検査溶液：　キットに添付の**CCYV陽性コントロール**を添加すると、CCYVゲノムRNAに特徴的な配列が増幅され発色します。

重要

検査の成否に関しましては、最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

器具、機器の準備

■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1回分注するごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に**CCYV陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび**CCYV陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■ 作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では**CCYV陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。

検査溶液へのサンプルおよび**CCYV陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去が可能です。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

＜方法＞

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv) 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に1時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v) 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

重要

本キットでは、キュウリあるいはメロンの葉からウリ類退緑黄化ウイルスゲノムRNAを抽出するプロトコルとして、**＜チューブキャプチャー法＞**と**＜爪楊枝法＞**を備えています。どちらかの方法で**RNAサンプルの作製**を行ってください。**＜チューブキャプチャー法＞**で作製したRNAサンプルは保存することが可能であるため、検査結果が無効となった場合でも再試験が可能です。高速遠心機を使用しない場合は、**＜爪楊枝法＞**によりRNAサンプルを作製して、1回の検査反応で使い切ってください。

RNAサンプルの作製

＜チューブキャプチャー法＞

①RNA抽出

パンチ等で6 mmの大きさに打ち抜いた葉5枚を1.5 mlチューブに入れ、蒸留水1 mlを添加して、ペッスルで磨砕します。

②RNA吸着

5,000 rpm、30秒間、室温にて遠心し、上清25 µlを新しい1.5 mlチューブに移して、**CCYV吸着液**75 µlを添加します。十分に混和した後、5,000−15,000 rpm、1分間、室温にて遠心し、**CCYV吸着液**をマイクロピペットで除去します。

③RNA洗浄

CCYV洗浄液300 µlをチューブの底に添加した後、マイクロピペットで除去します。再度、新しい**CCYV洗浄液**300 µlをチューブの底に添加した後、マイクロピペットで除去します。最後に、蒸留水50 µlを添加して、チューブ壁面に吸着したRNAを溶解します。この溶液をRNAサンプルとします。

重要

一連の操作において、RNAの沈殿を目視にて確認することはできませんが、検査をするのに十分な量のRNAがチューブ壁面に吸着しています。**CCYV吸着液**と**CCYV洗浄液**を除去する際は、マイクロピペットでゆっくりと吸い取ってください。

＜爪楊枝法＞

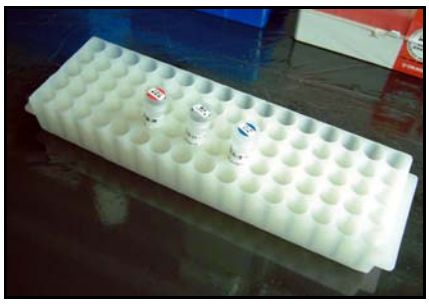
核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、蒸留水5 µlを分注します。葉脈部を爪楊枝で10回程度突き、**検査用チューブ**内の蒸留水に軽く懸濁します。この溶液をRNAサンプルとします。

重要

＜爪楊枝法＞では、RNAサンプルに検査溶液を添加した後、検査反応を行いますので、本キットに添付の**検査用チューブ**を使用してください。

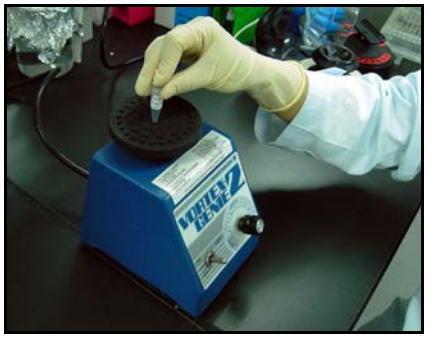
検査溶液の作製

試薬の融解



CCYV検査液、**CCYV陽性コントロール**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**CCYV酵素液**および**蛍光発色液は**-20℃では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて1秒間×3回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製

マイクロチューブ（1.5 mlあるいは2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて1秒間×3回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

試薬	1テストあたり	8+1テスト分*	24+1テスト分*
CCYV検査液	21.0 µl	189.0 µl	525.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
CCYV酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査溶液合計	23.0 µl	207.0 µl	575.0 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1テスト分多めに作製する。

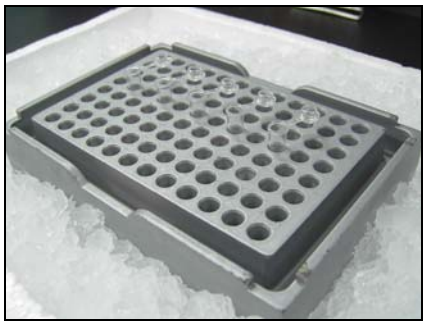
重要

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは1回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

重要

CCYV酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンダウンを行ってください。

検査溶液の分注



＜チューブキャプチャー法＞の場合、核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を23.0 µlずつ分注します。

＜爪楊枝法＞の場合、RNAサンプルの入った**検査用チューブ**をアルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を23.0 µlずつ分注します。

コントロールを作製する場合は、以降の**RNAサンプルの添加**を参照してください。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

重要

＜爪楊枝法＞の場合、連続分注を行うと検査溶液にRNAサンプルが混入する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは1回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

RNAサンプルの添加

＜チューブキャプチャー法＞では、RNAサンプル2.0 µlを検査溶液に添加します。全てのサンプルを添加した後、各チューブに**ミネラルオイル**を20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。

コントロールを作製する場合は、以下の手順で操作を行ってください。

i) RNAサンプル添加の前に陰性コントロール検査溶液用のチューブに20.0 µlの**ミネラルオイル**を分注してキャップを閉じます。
ii) RNAサンプル検査溶液用のチューブにRNAサンプルを添加し、各チューブに**ミネラルオイル**を20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。
iii) 陽性コントロール検査溶液用のチューブに**CCYV陽性コントロール**を2.0 µl添加し、**ミネラルオイル**を20.0 µl分注してキャップを閉じます。

＜爪楊枝法＞では、全ての検査溶液を分注した後、各チューブに**ミネラルオイル**を20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。

コントロールを作製する場合は、以下の手順で操作を行ってください。

i) RNAサンプルに検査溶液を分注する前に、**検査用チューブ**2本（陰性コントロール検査溶液用と陽性コントロール検査溶液用）を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を23.0 µlずつ分注します。
ii) 陰性コントロール検査溶液用のチューブに20.0 µlの**ミネラルオイル**を分注してキャップを閉じます。
iii) RNAサンプルの入った**検査用チューブ**に検査溶液を添加し、各チューブに**ミネラルオイル**を20.0 µlずつ分注してキャップを閉じます。
iv) 陽性コントロール検査溶液用のチューブに**CCYV陽性コントロール**を2.0 µl添加し、**ミネラルオイル**を20.0 µl分注してキャップを閉じます。

検査反応

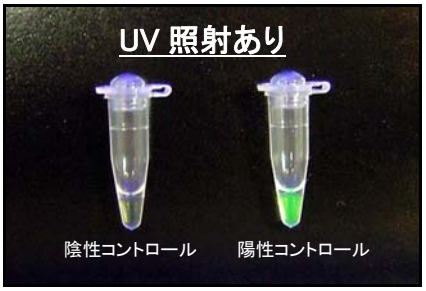
ヒートブロック

＜チューブキャプチャー法＞あるいは＜爪楊枝法＞で作製した全サンプルのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて1秒間×3回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、サーマルサイクラー、インキュベーター、あるいはウォーターバスとフロートプレートを用いて63℃で60分間保温します。

フロートプレート

判定

検査の成否の判定



60分間保温した後、80℃で2分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240–260 nmあるいは350–370 nmの波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は60分間が経過した時点で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

RNAサンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、RNAサンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にウリ類退緑黄化ウイルスが存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるRNAサンプル

「**ウリ類退緑黄化ウイルス陽性**」と判定します。

仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、対象とする植物から別の葉を採取して再度検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないRNAサンプル

「**ウリ類退緑黄化ウイルス陰性**」と判定します。

病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は、対象とする植物から複数箇所の葉を採取して再度検査を行ってください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. CCYV陽性コントロールの添加量が過剰である。** **CCYV陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**CCYV陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240-260 nmあるいは350-370 nmの波長を出力するUV照射装置が必要です。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。 **C. 試薬がフィルター付マイクロチップの周りに付着している。** 試薬の液面付近にフィルター付マイクロチップ先端を浸けて、分注操作を行ってください。特に、**CCYV酵素液**は粘性が高く、付着しやすいのでご注意ください。

6. 文献・資料

1. 行徳 裕 (2008) メロンおよびキュウリ退緑黄化病 (仮称) の発生と防除対策 植物防疫 **62** (8): 424

2. 行徳 裕・岡崎 真一郎・古田 明子・衞藤 友紀・溝辺 真・久野 公子・林田 慎一・奥田 充 (2009) 新規クリニウイルスによるメロン退緑黄化病 (新称) の発生 日植病報 **75**: 109

3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

4. 奥田 充 (2009) キュウリ、メロンの退緑黄化病の原因ウイルスと防除技術 今月の農業 **52**: 72

5. Okuda M., Okazaki S, Yamasaki S, Okuda S Sugiyama M. (2010) Host Range and Complete Genome Sequence of Cucurbit chlorotic yellows virus, a New Member of the Genus Crinivirus. *Phytopathology* **100**: 560

6. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の**CCYV陽性コントロール**2.0 µlを鋳型として25.0 µl（1テスト分）の容量でDNA増幅反応を行い、63°C、60分間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

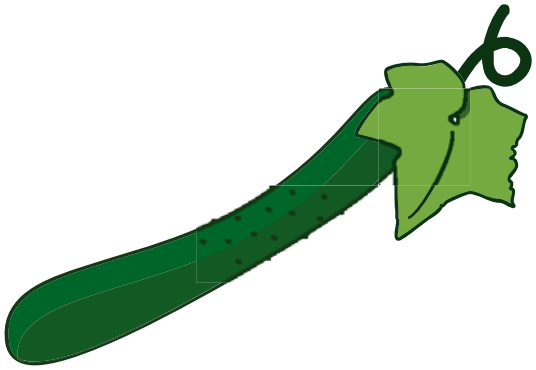
【CCYV陽性コントロールのコピー数】

CCYV陽性コントロールには、2.0 µlあたり1x 10^6コピーの標的配列が含まれています。

【メモ】

【メモ】

ニッポン・ジーン



- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2015 年 5 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-6712-3885
FAX	03-6712-3886
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp

Copyright © 2015 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.